



EESTI MAAÜLIKOOL

Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Elisabeth-Lisette Kõrve

**PEPIINO MOSAIKVIIRUSE ESINEMINE EESTIS  
MÜÜDAVATES TOMATIVILJADES**

**DETECTION OF PEPINO MOSAIC VIRUS IN IMPORTED  
TOMATO FRUIT IN ESTONIA**

Bakalaureusetöö

Aianduse õppekava

Juhendajad: Professor Anders Kvarnheden, *PhD*

Kadri Just, *PhD*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51006			
Autor: Elisabeth-Lisette Kõrve		Õppekava: Aiandus	
Pealkiri: * Pepiino mosaiikviiruse esinemine Eestis müütavates tomatites			
Lehekülgi: 41	Jooniseid: 23	Tabeleid: 9	Lisasid: 2
<p>Osakond / Õppetool: Taimetervise Õppetool</p> <p>ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused (B390)</p> <p>Juhendajad: Professor Anders Kvarnheden, <i>PhD</i>, Kadri Just, <i>PhD</i></p> <p>Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2021</p>			
<p>Pepiino mosaiikviirus (PepMV, <i>Pepino mosaic virus</i>, perekond <i>Potexvirus</i>, sugukond <i>Alphaflexiviridae</i>) on mehhaanilisel teel ning seemnete kaudu leviv ohtlik tomativiirus. Seni ei ole seda Eesti katmikaladel leitud. Esmakordselt kirjeldati PepMV nakkus 1980. aastal Peruust pepiino (<i>Solanum muricatum</i>) taimedest (Jones <i>et al.</i> 1980). Pea 20 aastat hiljem diagnoositi viirus Hollandi kasvuhoones kasvatatud tomatitaimedelt uuesti. Tänapäevaks on viirust leitud mitmetest riikidest nii Euroopas, Aasias, Põhja- ja Lõuna-Ameerikas kui ka Aafrikas. Arvestades viiruse levikuomadusi, on tõenäoline, et PepMV on laiemalt levinud kui praegu ametlikult arvatud (CABI).</p> <p>Töö eesmärk oli selgitada, kas Eestis müüdavad tomativiljad on nakatunud mehhaanilisel teel leviva PepMV-ga ning hüpoteesiks oli, et meile imporditud tomativiljad on selle viirusega nakatunud. PepMV esialgseks määramiseks kasutati kiirtesti ning positiivsetest proovidest analüüsiti viiruse esinemist molekulaarselt RNA eraldamise ning RT-PCR teel. Viiruse genotüübiline määramine viidi läbi RFLP ning DNA järjestuste sekveneerimise abil.</p> <p>Testitud 25 imporditud tomatiproovist osutusid kiirtesti põhjal positiivseks 68% (17 proovi 25-st) ning molekulaarse määramise põhjal oli positiivseid proove 48% valimikust (12 25-st). Enamik positiivseid proove pärines Hispaaniast ja Hollandist ning genotüübiliselt kuulusid enamik proove CH2 genotüüpi. Töö põhjal saab järeldada, et</p>			

PepMV levik on Eestisse imporditud tomatiga sage. Kuna PepMV kandub edasi nii mehhaaniliselt kui ka seemnetega, tasub imporditud tomativiljade käsitlemisel olla ettevaatlik ning rakendada fütosanitaarseid profülaktilisi võtteid, vältimaks viiruse levitamist. Imporditud tomatist pärit seemnetest tomati kasvatamine ei ole soovitatav, kuna eksisteerib oht levitada seemnetega edasikanduvaid viirushaigusi.

Märksõnad: PepMV, *Solanum Lycopersicum*, AgriStrip, RFLP-RT-PCR

Estonian University of Life Sciences		Abstract of Bachelor's Thesis	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51006			
Author: Elisabeth-Lisette Kõrve		Curriculum: Horticulture	
Title: detection of Pepino mosaic virus in imported tomato fruit in Estonia			
Pages: 41	Figures: 23	Tables: 9	Appendixes: 2
Department / Chair: Department of Plant Protection			
Field of research and (CERC S) code: Agricultural Research, B390			
Supervisors: Professor Anders Kvarnheden, <i>PhD</i> , Kadri Just, <i>PhD</i>			
Place and date: Tartu 2021			
<p>Pepino mosaic virus (PepMV, <i>Pepino mosaic virus</i>, genus <i>Potexvirus</i>, family <i>Alphaflexiviridae</i>) is one of the most severe tomato virus. It is transmitted mechanically and at low level by seeds. It has yet not been found in greenhouses in Estonia. PepMV was first described in 1980 in Peru, where the virus was isolated from pepino (<i>Solanum muricatum</i>) plants (Jones <i>et al.</i> 1980). 20 years later, it was diagnosed in tomato plants grown in the greenhouses in The Netherland. Today, PepMV has spread around the world to Europe, Asia, North and South America and to Africa. Knowing how this virus spreads, it is probable that the virus has spread further than it is officially recognized (CABI).</p> <p>The purpose of this work was to study if the tomatoes sold in Estonia are infected by PepMV and to reveal the genotypes of the detected isolates. The hypothesis was that imported tomato fruit are infected by PepMV. To determine the virus presence, tomato fruit were first screened by fast test (Agristrio, Bioreba). Positive samples were then analysed for PepMV by molecular methods such as RNA isolation and RT-PCR. Virus genotyping was performed using RFLP and DNA sequencing.</p> <p>Among 25 imported tomato samples, fast test was positive for 68% of the samples (17 out of 25). However, 48 % (12 out of 25) were positive after molecular detection. Most of the positive samples originated from Spain and The Netherlands and genotypically they mostly belonged to CH2 strain. It can be concluded that PepMV spread to Estonia by imported tomato fruit is common. Since PepMV is transmitted both mechanically and by seeds, caution should be used when handling imported tomato fruit and phytosanitary</p>			

prophylactic techniques should be applied to prevent the spread of the virus. It is recommended not to grow tomatoes from the seeds derived from imported tomato fruit as there is a risk of propagating the seed-transmitted viruses.

Keywords: PepMV, *Solanum Lycopersicum*, Agristrip, RFLP-RT-PCR

# SISUKORD

<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>9</b>
1.1. Harilik tomat .....	9
1.2. Pepiino mosaiikviirus ja selle genotüübid .....	9
1.3. PepMV peremeestaimed ja sümptomid .....	10
1.4. PepMV levik, säilimine, tõrje ja profülaktika.....	11
1.5. Kiirtestide tulemuslikkus haiguste tuvastamisel .....	12
1.6. PepMV Eestis .....	13
<b>2. MATERJAL JA METOODIKA.....</b>	<b>14</b>
2.1. PePMV määramine kiirtestiga .....	14
2.2. PePMV molekulaarne määramine .....	15
3.2.1. RNA eraldamine .....	15
3.2.2. RNA kontsentratsiooni määramine .....	16
3.2.3. RNA puhastamine DNA-st (DNase töötlus) .....	16
3.2.4. Pöördtranskriptsioon ehk cDNA süntees.....	17
3.2.5. PCR amplifikatsioon PepMV molekulaarseks määramiseks .....	17
3.2.6. DNA visualiseerimine geelelektroforeesiga .....	18
3.2.7. PepMV genotüüpide määramine RFLP abil.....	19
3.2.8. PCR amplifikatsiooniproduktide puhastamine.....	20
3.2.9. DNA järjestuse sekveneerimine .....	20
<b>3. TULEMUSED JA ARUTELU .....</b>	<b>22</b>
3.1. PepMV määramine kiirtestiga .....	22
3.2 PepMV molekulaarne määramine .....	23
3.2.1. RNA eraldamine ja kontsentratsioon.....	23
3.2.2. Pöördtranskriptsioon ehk cDNA süntees.....	24
3.2.3. PepMV amplifikatsioon RT-PCR-ga .....	25
3.2.4. PepMV genotüüpide määramine .....	27
3.2.5. PepMV proovide sekveneerimine .....	31
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>34</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>35</b>

<b>LISAD.....</b>	<b>39</b>
Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta .....	40
Lisa 2. Fragment PepMV genotüüpide nukleotiidi järjestuste joonduste konstrueerimisest .....	41

## SISSEJUHATUS

Tomat (*Solanum lycopersicum*) on globaalselt üks olulisemaid köögiviljakultuure. Paljudes tomatikasvatuse piirkondades on viirushaigused peamiseks limiteerivaks teguriks selle kultuuri kasvatamisel. Pepiino mosaiikviirus (*Pepino mosaic virus*, PepMV) on üks olulisemaid tomati viirushaigusi katmikaladel (Hannsen *et al.* 2008; Davino *et al.* 2017). PepMV kuulub *Potexvirus* perekonda, *Alphaflexiviridae* sugukonda. PepMV kuulub Euroopa Taimekaiste Organisatsiooni (EPPO) A2 nimekirja. See tähendab, et tegu on taimehaigusega, mida esineb lokaalselt Euroopa Liidu aladel ja mida soovitatakse käsitleda karantiinsena (EPPO 2021). Viirus tuvastati esmakordselt Peruu 1974. aastal pepiino (*Solanum muricatum*) viljades. Pepiino taimi kasvatati nende viljade pärast, mida söödi värskelt või kasutati salatites (Blancard 2012).

Peale esialgset viiruse tuvastamist ei arvestatud sellega kui ohuna tomatikasvatuses, sest peale 1980. aastat ei esinenud uusi haiguse juhtumeid. Kuid 1999. aastal leiti viirus tomatikultuuridelt Ühendkuningriikidest ja Hollandist. Peagi avastati, et viirus oli levinud globaalselt, kõikidele mandritele ning sellest sai tomatikasvandustes tõsine probleem. (Mahy *et al.* 2008). Mõnedes tomati kasvuhoonetes on täheldatud, et kuni 90% tomatitest on viirusega nakatunud ning PepMV võib põhjustada kuni 40% saagikadu (Soler *et al.* 2000). Mõningatel juhtudel on täheldatud ka täielikku saagikadu (Soler-Alexandre *et al.* 2005).

Euroopas esineb vähemalt kolm PepMV genotüüpi, mis on erineva virulentsuse ja sümptomitega nii tomatil kui ka teistel alternatiivsetel peremeestaimedel (Blystad *et al.* 2015). Töö eesmärk oli selgitada, kas PepMV on jõudnud koos imporditud tomatitega Eestisse ning selgitada viiruse genotüübiline kuuluvus. Patogeenide stabiliseerumise vältimiseks uutal aladel on väga oluline nende monitooring ja varajane avastamine. Töö hüpoteesiks on, et Eestis müüdavad tomativiljad on nakatunud Pepiino mosaiikviirusega. Kiirestiga positiivseks ostunud proovidest määrati viirus molekulaarselt.



# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Harilik tomat

Tomat on üheaastane taim rohttaimede perekonnas, maavitsaliste (*Solanaceae*) sugukonnas. Tomatid on pärit Lõuna-Ameerikast, kus neid kasvasid asteegid ja maiad. Looduses kasvavad tomatid Ecuadoris, põhja Tšiilis, Peruu ja Galapagose saartel (Harland *et al.* 2009). Tänapäeval kultiveeritakse üle 5000 erineva sordi tomatitaimi ülemaailmselt.

Kõige tavapärasem tomati taime kõrgus on 2.5 m, kuid on olemas nii 15 cm pikkusi kui ka 10 m pikkuseid tomatitaimi (Harland *et al.* 2009). Tomati lehed on sordist olenevalt rohkem või vähem karvased, tugeva lõhnaga ja kuni 45 cm pikkused. Tomati õied on 5 kroonlehega, kollased ja 2 cm diameetriga. Tomati viljad on botaaniliselt marjad, mille läbimõõdud varieeruvad olenevalt sordist, kõige tavapärasemalt on viljade suurus 1,5-7,5 cm. Viljade tuntuim värv on punane, kuid leidub ka kollaseid, tumedaid ja veel mitmeid erinevaid värve tomateid. Viljade kujud varieeruvad samuti, on olemas ümaraid, ovaalseid, suuri lihakaide jms. Taimi toestatakse nõõride ja ka keppidega, kuna vilja kandes muutuvad oksad raskeks ja võivad ära murduda (Britannica 2019). Tomateid kasvatatakse peamiselt kasvuhoonetes, kuna see taim on soojalembene ja väga valgusnõudlik (Pikk, *s.a.*).

## 1.2. Pepiino mosaiikviirus ja selle genotüübid

Viiruse genoom on 6410 nukleotiidi (nt) pikkune RNA üksikahel (Aguilar *et al.* 2002) ning viiruse osakesed ehk virionid on vardakujulised ja 508 nm suurused (Jones *et al.* 1980). PepMV-l on viis geeni: RNA-st sõltuv RNA polümeraas (RdRp), kolmekordne geeniblokk, katte valk (coat proten, CP) ning kaks lühikest mittekodeerivat ala (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002). PepMV on põhjustanud märkimisväärsed agronoomilisi probleeme suhteliselt lühikese aja jooksul. See viirus on kergesti mehaaniliselt leviv ning suudab nakatada tomatit (*Solanum Lycopersicum*) ja teisi maavitsaliste (*Solanaceae*) sugukonda kuuluvaid peremeestaimi (Van der Vlugt 2009).

Esimesed PepMV tuvastamised Euroopas olid 1998. aastal Hollandis. Peale seda avastati seal veel vähemalt 40 viiruse puhangut tomati kasvuhoonetes. Hiljem levis viirus edasi Ühendkuningriiki, Belgiasse, Saksamaale ja Austriasse. PepMV on tuvastatud ka Hispaanias, Taanis, Soomes, Rootsis ja Itaalias. Prantsusmaal oli kolm puhangut aastatel 2000 ja 2001. Viirus jõudis ka Marokosse ning Põhja-Ameerikasse, kus seda on jälgitud alates 2001 aastast (Blancard 2012).

PepMV on tuvastatud erinevad viiruse genotüübid ehk tüved. Molekulaarsetele ja bioloogilistele omadustele vastavalt on need jaotatud praeagu kuueks: Euroopa (EU), Põhja-Ameerika (US1(CH1), Tšiili (CH2), Peruu (LP), uus Peruu (PES) ning rekombinantne genotüüp (US2) (Hanssen, Thomma 2010; Moreno-Pérez *et al.*, 2014). Genotüüpide vahel on erinevused virulentsuses, sümptomites ja ka nukleotiidjärjestuses (Blancard 2012). Kui algselt levis Euroopas vaid EU genotüüs, siis alates 2005. aastast on siin valdav CH2 tüvi (Davino *et al.* 2017).

Sagedased on segainfektsioonid, kus korraga on taim nakatunud erinevate PepMV tüvedega (Hanssen *et al.* 2008). RNA viiruste evolutsioonis on rekombinatsioonil väga oluline roll (Moya *et al.*, 2004). Täheldatud on ka seda, et segainfektsioon mitme viiruse tüvega põhjustab tugevamaid sümptomeid ning tüvede rekombineerumisel on see oluliseks evolutsiooniliseks teguriks viiruse agressiivsuse suurenemisel (Hanssen *et al.*, 2008). Uuringutes on leitud, et segainfektsioonides levib CH2 genotüüp katmikaladel kiiremini kui EU. See viitab, et ilmselt on CH2 genotüübil EU omaga võrreldes teatud bioloogiline eelis (Hanssen *et al.*, 2008). Arvestades PepMV kiiret levikut ja evolutsiooni, võib eeldada, et uute viiruse tüvede ilmumine on ootuspärane, sealhulgas ka uutel peremeestaimedel (Davino *et al.* 2017).

### **1.3. PepMV peremeestaimed ja sümptomid**

PepMV on kergesti mehaaniliselt leviv ning suudab lisaks tomatile (*Solanum Lycopersicum*) ja pepiinole (*Solanum muricatum*) nakatada mitmeid teisi maavitsaliste (*Solanaceae*) sugukonda kuuluvaid peremeestaimi (Van der Vlugt 2009) nagu harilik ogaõun (*Datura stramonium* L.), tubakas (*Nicotiana benthamiana*), Florida füüsal (*Physalis Floridana* L.), harilik baklažaan (*Solanum melongena* L.) ning harilik kartul (*Solanum tuberosum* L.) (Bibi 2017) ja tubakas *Nicotiana benthamiana*. *N. occidentalis* on kasulik indikaatortaim PepMV

uuringutes, kuna sellele taimele põhjustavad sümptomeid kõik PepMV genotüüpid (Blystad *et al.* 2015). Kas basiilik on PepMV peremeestaim (Davino *et al.* 2009) ning lisaks on tomatite katmikalade ümbruses täheldatud arvukalt asümptomaatilisi PepMV-ga nakatunud looduslikke rohhtaimi (Jordá *et al.*, 2001).

Pepiino mosaiikviiruse sümptomiteks on mosaiiksus, kollased täpid või ka klorootilised laigud. Samuti võib esineda lehtede deformatsioone ja leheäärte keerdumist üles- või allapoole. Taime kasv võib pidurduda ning lehed võivad muutuda tumedamaks ja kitsamaks. Lisaks võivad vartel esineda pruunid ja korkjad muhud. Taime õied võivad pruunistuda või lausa känguda. Viljadel võib esineda mosaiiksust, eriti kui need on küpsed. Mosaiiksus võib olla ka ainuke nähtav sümptom taimel. Haiged taimed võivad hakata vananema varem kui tavaliselt. Kõige olulisem PepMV põhjustatud sümptom on aga lükopeeni ebaühtlasest jaotumisest põhjustatud vilja ebaühtlane värvumine, sest see vähendab vilja kaubanduslikku väärtust (Soler *et al.* 2000; Mumford, Metcalfe 2001; Roggero *et al.*, 2001; Spence *et al.*, 2006). Samas võib viljadel nakkus esineda ka asümptomaatiliselt (Blancard 2012), mis teeb viiruse tahtmatu levitamise paraku väga lihtsaks.

Sümptomid on tugevasti mõjutatavad kliimast, eriti temperatuurist ja valgusest kasvuhoonetes. Neid on lihtne märgata sügisest kevadeni, kuid võivad kaduda kuumade ja valgete ilmadega. Haigus võib väljenduda erinevalt olenevalt taime kasvufaasist ja sordist. Mõnikord võib haigus täiesti märkamatuks jääda, vaatamata sellele, et mitmed taimed on haigestunud või väljendub haigus ainult üksikutel lehtedel ja viljadel (Blancard 2012). On leitud, et mitme genotüübiga seganakkuse korral on PepMV põhjustatud sümptomid tugevamad, seda genotüübie omavahelise sünergismi või rekombineerunud genotüüpide suurema virulentsuse tõttu (Hanssen *et al.* 2008).

#### **1.4. PepMV levik, säilimine, tõrje ja profülaktika**

Kuna PepMV on mehhaaniliselt edasikanduv viirus, siis levib see väga kergesti taimehooldusvõtete teel, nt. istutamisel, samuti hüdoprootilistes süsteemides ja ka seemnete kaudu (Davino *et al.*, 2017; Córdoba-Sellés *et al.* 2007; Hanssen *et al.* 2010a). Viirust võivad tolmeldades edasi kanda ka kimalased (Shipp *et al.* 2008) ning vektoriteks on ka seen *Olpidium virulentus* (Alfaro-Fernández *et al.* 2010), lutikas *Macrolophus caliginosus*

(Klapwijk, Stijer 2000) ning meie katmikaladel väga levinud kasvuhoone karilane *Trialeurodes vaporariorum* (Noël *et al.* 2014).

PepMV säilib mullas ja taimejäänustel, kuivanud taimsel materjalil võib viirus säilida kuni 90 päeva. Riided, mis on kokku puutunud viirusega, võivad kanda seda kuni vähemalt 14 päeva (Ferguson 2001). PePMV suudab säilida ka seemnetes (Córdoba-Sellés *et al.* 2007) ning võib püsida vees, mis on  $20 \pm 4$  °C nakkusohtlikuna kuni kolm nädalat (Mehle 2014).

Näiteks Sitsiilias on PepMV kiire leviku põhjusteks peetud teadmatust sümptomitest, profülaktiliste meetmete mitterakendamist ning mitteametliku taimse istutusmaterjali paljundamist ja levitamist (Davino *et al.* 2017). Selleks, et viiruse sissetulekut ja levitamist kasvuhoonetes ennetada, on äärmiselt oluline fütosanitaarne profülaktika. Olulised on käte pesemine kuuma seebi ja veega ning märgade jalanõude desinfitseerimine enne kasvuhoonesse minekut. Kasutada ühekordseid pea, keha, käte ja jalgade kaitsevahendeid. Eemaldada kasvuhoonetest kõik potentsiaalsed viirust säilitavad ja levitavad elemendid nagu maha langenud viljad, eelmiste taimede jäänused, samuti tasub eemaldada umbrohte. Nakatunud mullasubstraadi kotid tuleb hävitada.

Kasvuhoonetes, kus tuvastatakse haiged taimed, tuleb peale taimede eemaldamist oodata vähemalt kolm nädalat enne uute taimede istutamist. Kogu kasvuhoone pinnad, tööriistad ning koridorid tuleb ära pesta veega ning kasutada desinfitseerivaid lahuseid nagu naatriumhüdrosiid (0,125%) 0,01% naatriumhüpokloriid, 10% trinaatriumfosfaat või 1% orgaanilised happed (Bibi 2017). Viiruse eemaldamiseks seemnetest on leitud, et efektiivselt toimib seemnete leotamine 10% trinaatriumfosfaat lahuses 3 tundi (Córdoba-Sellés *et al.* 2007).

## **1.5. Kiirtestide tulemuslikkus haiguste tuvastamisel**

Taimehaigusi on võimalik kiirtestide abil kiirelt tuvastada ning selekteerida välja täpsemaks molekulaarseks määramiseks. Erinevate haiguste jaoks on erinevad kiirtestid, mis on välja töötatud spetsiifiliselt patogeeni jaoks. Immuunanalüüsis kasutati AgriStrip ja Pocket Diagnostic kiirtesti komplekte viljapuu-bakterpõletiku (*Erwinia amylovora*) määramiseks. Väga väike kogus patogeenset materjali koguti hambatikuga, millest piisas, et kiirtestid näitaksid positiivset tulemust. Haigelt taimelt võeti materjali bakteriaalselt väljavoolult ja

haige oksa koore alt kambiumi kihti. AgriStrip komplekt näitas suurt spetsiifilisust viljapuu-bakterpõletiku osas, kuid Pocket Diagnostics näitas ka positiivseid tulemusi *E. pyrifolia* suhtes (Singh *et al.*, 2020). AgriStrip on varasemates uuringutes positiivseid tulemusi andnud ka *E. pyrifolia* ja *E. piriflorinigrans* osas (Braun-Kiewnick *et al.* 2011). Kiirtesti võrdluses LAMP ja qPCR diagnostiliste meetoditega, on kiirtestid siiski madalama täpsusega (Singh *et al.*, 2020).

## **1.6. PepMV Eestis**

Kuna PepMV on tomatikasvandustele ohtlik viirushaigus, siis on oluline kontrollida selle sisse tulekut Eestisse. Viimati vaadeldi siin PepMV esinemist 2004 aasta augustis. Uuring oli suunatud kasvuhoonetes kasvatatavate tomatitele ja see teostati 23 katmikalal, kus vaadeldi taimi ja vilju. Proove võeti ka neilt taimedelt, millel sümptomid puudusid. Üks proov koosnes kümnest taime lehest, mis olid võetud eri taimedelt. Kokku võeti 70 proovi, ning need saadeti laborisse, kus neid testiti ELISA meetodil. Kõik proovid olid negatiivsed ja 2004 aasta PepMV uuringu käigus ei leitud seda Eestis tomatikasvandustes (EPPO Global Database).

## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1. PePMV määramine kiirtestiga

Kiirtest on hea moodus nakatunud taimede kiireks selekteerimiseks. Nii saab identifitseerida proovid, mida molekulaarselt täpsemalt uurida. Iga testitud imporditud tomativilja proov koosnes kolmest viljast, mis testiti koos ühtse proovina (Joonis 1). Proove testiti PepMV-ga nakkuse kindlakstegemiseks kiirtestiga Agristrip (Bioreba) (Joonis 2.A). Kolme tomativilja kooreosast võeti kokku ~1,6 x 1,6 cm suurune tükk ja asetati see ekstraktsioonikotti, kuhu lisati juurde 3 ml lahust „A“ (Joonis 2. B). Proovi homogeniseeriti, kuni viljatükid olid



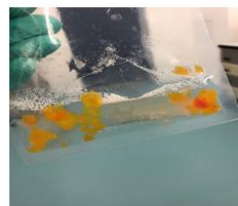
**Joonis 1.** Tomativiljad ühe proovi jaoks. Foto: E.L. Kõrve.



A. TMV kiirtest



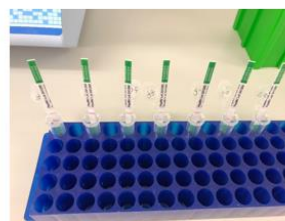
B. Proov ekstraktsioonikotis



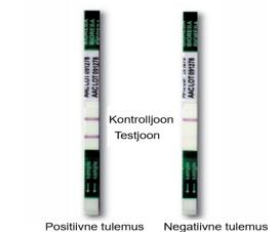
C. Proovi homogeniseerimine



D. Homogeniseeritud proovi asetamine testtubibi



E. Testribad proovi tubides



F. Tulemuste võrdlus

**Joonis 2.** PepMV määramine Bioreba kiirtestiga. B, D ja F: Bioreba, A: K. Just, C ja E: E.L. Kõrve.

lahustunud ja lahus punakaks värvunud (Joonis 2.C). Ekstraktsioonikotist pipeteeriti 37,5 µl homogeniseeritud lahust ja asetati see testtuubi, kuhu lisati 112,5 µl ekstraktsioonilahust „A“ (kokku 150 µl) (Joonis 2.D). Seejärel asetati testriba noolte ja „*Sample*“ otsaga lahusesse ja oodati triipude teket (ootaeg ~2-15 min) (Joonis 2.E). Kahe triibu ilmnemine tähendab, et proov on viirusega nakatunud ja üks triip näitab, et proovis viirust ei ole (Joonis 2.F).

## **2.2. PePMV molekulaarne määramine**

### **3.2.1. RNA eraldamine**

RNA eraldati nendest proovidest, mis kiirtesti põhjal olid positiivsed. Samuti eraldati RNA ühest negatiivsest proovist negatiivse kontrolli jaoks. RNA eraldamiseks kasutati RNeasy Plant Mini Kit-i (Qiagen). Külmutatud tomativilja tükid asetati (~0.3g) uhmrisse, millesse eelnevalt valati veeldatud lämmastik (vN). Proov purustati nuiaga, protseduur viidi läbi kiiresti, laskmata proovil ülesse sulada. Vajadusel lisati vN-i juurde. Siis külmutati vN-s 2 ml tuub ning kaaluti sinna 0.1 g (100 mg) purustatud proovi pulbrit. Tuubi lisati 450 µl RLT puhvrit. Proovi segati Vortex masinal mõned hetked. Lahus pipeteeriti lillasse 2 ml kollektsioontuubi ning tsentrifuugiti 2 min täiskiirusel (13 400 rpm). Kollektsoontuubi põhjas olev lahus pipeteeriti ettevaatlikult uude 1.5 -2 ml tuubi nii, et ei puudutaks pipeti otsaga tuubi põhja kogunenud taime rakkude kogumit (enamik jäi kollektsioontuubi kinni, kuid osa läks ikkagi sellest läbi tuubi põhja). Tööd jätkati kollektsioontuubist läbi tulnud proovi lahusega.

Lahusele lisati 0.5-kordne kogus 96-100% etanooli (400 µl proovile lisati 200 µl etanooli) ning segati koheselt pipeteerides üles-alla 2-3 x. Tsentrifuugi selles etapis ei kasutatud. Proov pipeteeriti roosasse 2 ml kollektsioontuubi. Tuubi kaas suleti õrnalt ja tsentrifuugiti 15 s kiirusel 10 000 rpm. Siis valati ära tuubi põhja kogunenud vedelik. Tööd jätkati sama kollektsioontuubiga. Kollektsoontuubi lisati 700 µl RW1 puhvrit. Kaas suleti õrnalt ja tsentrifuugiti 15 s kiirusel 10 000 rpm. Tuubi põhja kogunenud vedelik visati ära, veendudes, et kogu vedelik oleks eemaldatud.

Tööd jätkati sama tuubiga, lisades sinna 500 µl RPE puhvrit. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugiti 15 s kiirusel 10 000 rpm. Tuubi põhja kogunenud vedelik visati ära ja jätkati

tööd sama tuubiga. Proovile lisati veelkord 500 µl RPE puhvrit. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugi 2 min kiirusel 10 000 rpm. Pärast tsentrifuugi eemaldati tuubis olev kollektsioonkolonn ettevaatlikult, nii et see ei läheks kontakti välimises tuubis oleva lahusega. Kollektsioonkolonn asetati uude ilma kaaneta 2 ml tuubi ja tsentrifuugi täiskiirusel üks min. Seejärel asetati kollektsioonkolonn uude 1.5 ml tuubi ja lisati sinna 50 µl RNase-vaba vett. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugi üks min kiirusel 10 000 rpm. Sellega oligi taime RNA koos taimerakkudes paikneva viiruse RNA-ga eraldatud.

### 3.2.2. RNA kontsentratsiooni määramine

RNA kontsentratsiooni määrati NanoDrop 1000 spektrofotomeetriaga (Thermo Fisher Scientific) (Joonis 8). Esmalt pipeteeriti kalibreerimiseks 2 µl vett. Seejärel puhastati paberiga proovi mõõtmise koht ning uue pipetiotsikuga pipeteeriti RNA kontsentratsiooni määramiseks 2 µl proovi. Protseduuri korrati kõigi proovidega.



**Joonis 8.** RNA kontsentratsiooni määramine. E.L. Kõrve.

### 3.2.3. RNA puhastamine DNA-st (DNase töötlus)

Selleks, et eemaldada genoomne DNA RNA-st, viidi läbi DNase töötlus, kasutades RNase-vaba DNase-i (Thermo Scientific). Reaktsioonituubi pipeteeriti RNA ( $1 \mu\text{g}^1$ ) (st. 1000 ng. Kogus arvutatakse vastavalt eelmises punktis tehtud RNA kontsentratsiooni mõõtmistele. Kui RNA kontsentratsioon oli  $1000 \text{ ng} / 1 \mu\text{l}$ , siis kasutati  $1 \mu\text{l}$  RNA-d), 10 x reaktsiooni puhver  $\text{MgCl}_2$ -ga ( $1 \mu\text{l}$ ), DNase I, RNase-vaba ( $1 \mu\text{l}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  (kuni  $10 \mu\text{l}^2$ ).



Proove inkubeeri 30 min 37°C. Seejärel lisa reaktsioonidele 1 µl 50 mM EDTA-d ja inkubeeri 10 min 65 °C. Tuube säilitati -20°C (kuni 2 nädalat) või - 80°C (pikemaks säilitamiseks). Seda DNA-st puhastatud RNA-d kasutati järgnevalt pöördtranskriptsiooniks.

#### 3.2.4. Pöördtranskriptsioon ehk cDNA süntees

Pöördtranskriptsioon on geneetilise informatsiooni ülekanne RNA-lt DNA-le- st. DNA süntees RNA järgi, kui tekib cDNA ehk komplementaarne DNA (Geneetika, 2021). RNA-st cDNA sünteesimiseks kasutati SOLIScript RT cDNA sünteesi komplekti (Solis BioDyne). PCR tuubi asetati järgnevad kemikaalid (Tabel 2):

**Tabel 2.** Pöördtranskriptsiooniks kasutatud kemikaalid

Reagent	Kogus, µl
RNA	5
Oligo(dT) praimerid	1
dNTP mix	0.5
10 x reaktsioonipuhver	2
SOLIScript RT	1
RiboGrip RNase inhibeerija	0.5
H <sub>2</sub> O	10
Kokku	20

cDNA sünteesiks inkubeeriti proove 60 min 50 °C, seejärel toimus ensüümi inaktiveerimine 85 °C 5 min. Saadud cDNA-d kasutati järgnevas sammus viiruse amplifitseerimiseks PCR-ga.

#### 3.2.5. PCR amplifikatsioon PepMV molekulaarseks määramiseks

Kuna eelnevalt viidi läbi pöördtranskriptsioon (ingl. k. *reverse transcription* ehk RT), siis kokku nimetatakse seda tehnikat RT-PCR. Reaktsioon viidi läbi, kasutades 5 x HOT FIREPol Blend Master Mix-i (Solis BioDyne). PCR reaktsioon koosnes järgnevatest reagentidest: 4 µl 5X Hot Firepol Master Mix, 1 µl praimer PepMV-TGB 5'-

CACACCAGAAGTGCTTAAAGCA-3', 1 µl praimer PepMV-UTR 5'-CTCTGATTAAGTTTCGAGTG-3', mis amplifitseerivad PepMV kattevalgust 845 nukleotiidi pikkuse lõigu (Mumford, Metcalfe 2001). Juurde lisati 2 µl cDNA ja 14.8 µl H<sub>2</sub>O. Proove tsentrifuugiti enne PCR reaktsiooni alustamist ning PCR programm on välja toodud Tabelis 3. PCR reaktsioon viidi läbi PCR termotsükleris Mastercycler Nexus (Eppendorf).

**Tabel 3.** PCR reaktsiooni tingimused

Programmi samm	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Esialgne denaturatsioon	94	2 min	1
Denaturatsioon	94	30 s	35
DNA kokkususulandumine <sup>1</sup>	56	30 s	35
Elongatsioon	72	30 s	35
Lõplik elongatsioon	72	4	1
Säilitamine	10	∞	

<sup>1</sup> DNA kokkususulandumine (ingl. DNA *annealing*)- DNA ahelate „kokkususulatamine”, üksikahelatest kaksikahelate teke (Geneetika, 2021 ).

<sup>2</sup> Elongatsioon- DNA, RNA, valgusünteesil teise ja järgnevate alaüksuste (nukleotiidi või aminohappe) lülitumine makromolekuli (DNA, RNA või polüpeptiid) koosseisu (Geneetika, 2021).

### 3.2.6. DNA visualiseerimine geelelektroforeesiga

PCR amplifikatsiooniproduktid visualiseeriti 1% agarooosi geelis. Selleks asetati 50 ml TE puhvri kohta klaaskolbi 0.5 g agarooosi pulbrit. Seda kuumutati mikrolaineahjus keemiseni, kuni agarooos on lahustunud. Lahus jahutati voolava kraanivee all maha, jälgides, et vesi kolbi ei satuks. Seejärel lisati 50 ml lahuse kohta 5 µl DNA visualiseerimise lahust ClearSight DNA Stain (Bioatlas) ning valati saadud lahus kolvist geeliraami. Sinna asetati geelikamm sisse ning oodati ~20 min, kuni geel on tahenenud. Seejärel pipeteeriti geeli 3-5

$\mu$ l PCR amplifikatsiooniproducti ning geeli jooksutati 125 V 25 min. Tulemus visualiseeriti UV-valguse boksis (Uvitec Cambridge) (Joonis 10).



**Joonis 10.** UV-valguse boks Uvitec Cambridge. Foto: E.L.Kõrve.

### **3.2.7. PepMV genotüüpide määramine RFLP abil**

Genotüüpide määramine teostati restriksiooni fragmentide pikkuse polümorfismi (ingl. k. *restriction fragment length polymorphisms*, RFLP) abil, kasutades ensüüme HindIII, NdeI, PvuII ja SacI (Thermo Scientific) (Tabel 4). RFLP on kahe või enama geneetilise pikkusvariandi esinemine genoomse DNA restriksioonil ehk lõikamisel restriksiooni ensüümidega. Need on restriктаasid- endonukleaasid, mis tunnevad ära lühikesi spetsiifilisi DNA- järjestusi ja lõikavad DNA molekuli antud restriksioonisaidi või selle lähedal katki (Geneetika, 2021).

Reaktsioon koosnes järgnevatest komponentidest: vesi 17  $\mu$ l, 10 X restriksioonipuhver 2  $\mu$ l, DNA 10  $\mu$ l, restriksiooniensüüm 1  $\mu$ l. Reaktsioone inkubeeriti 37 °C 5 min. DNA restriksioonifragmendid fraktsioneeriti elektroforeesil 1 % agarosi geelis ning PepMV genotüübid määrati vastavalt restriksiooni fragmentide pikkusele (Tabel 4). Kui PCR amplifikatsiooni produkt oli nelja erineva ensüümiga lõigatud, siis võrreldi tulemusi omavahel. Iga ensüümiga lõikamine annab kindla suurusega DNA fragmendi(d) agarosi geelil. Kui geelil on näha mitmele genotüübile omast DNA fragmentide mustrit, siis viitab see proovi üheaegsele nakkusele mitme genotüübiga.

**Tabel 4.** PepMV genotüüpide määramine RFLP- ga (Modifitseeritud Hanssen *et al.* 2008)

Restriktsooni ensüüm	PepMV genotüüp				
	EU	LP	CH2	US2	US1
Ilma ensüümita	845	845	845	845	845
HindIII	845	845	845	845	562 283
NdeI	367 478	367 478	845	845	845
PvuII	278 122 445	278 122 445	845	644 201	643 202
SacI	845	386 459	845	845	845

### 3.2.8. PCR amplifikatsiooniproduktide puhastamine

Positiivsed PCR amplifikatsiooniproduktid puhastati praimerite, dNTP-de, ensüümide ja soolade eemaldamiseks enne DNA sekveneerimisele saatmist. Selleks kasutati GeneJET™ PCR puhastamise komplekti (Thermo Scientific). Esmalt lisati PCR produktile 1:1 ruumala Binding Bufferit ning proovi segati pipeteerides. Seejärel pipeteeriti proov GeneJET puhastuskolonne ning tsentrifuugiti 30 s. Kolonne põhja kogunenud lahus visati ära ning kolonnile lisati 700 µl pesupuhvrit. Proove tsentrifuugiti 30 s. ning kolonne põhja kogunenud lahus visati taas ära. Pesupuhvri täielikukus eemaldamiseks tsentrifuugiti tühja puhastuskolonne veel üks min. Puhastuskolonne sees olev kollektsioonkolonn asetati uude 1,5 ml tuubi, kolonne lisati 50 µl elueerimispuhvrit ning tsentrifuugiti üks min. Puhastatud DNA-d säilitati -20 °C juures.

### 3.2.9. DNA järjestuse sekveneerimine

Sekveneerimisele saadeti proovid nr. 12, 13, 14, 21 ja 22. Proovide DNA järjestuste sekveneerimine viidi läbi tellimustööna Tartu Ülikooli Genoomika instituudi Eesti biokeskuse tuumiklaboris Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer'il ja kahel Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer masinal, kasutades PCR- spetsiifilisi primereid.

Sekveneritud PepMV CP DNA järjestustest eemaldati praimerite järjestused ning järgi jäi 714 nukleotiidi pikkune CP lõik. Fülogeneetiliseks analüüsiks võrreldi seda esmalt USA Riikliku Meditsiiniraamatukogu ja Riikliku Biotehnoloogia Teabekeskuse Geenipangas olemasolevate TMV isolaatidega, kasutades BLAST programmi (BLAST) ning sealt valiti fülogeneetiliseks analüüsiks välja kogum PepMV erinevate tüvede isolaate. Fülogeneetiline analüüs viidi läbi MEGA X tarkvaraga (Kumar *et al.* 2018). Nukleotiidijärjestuste joonduste konstrueerimiseks kasutati Clustal W algoritmi (Larkin *et al.* 2007) ja Tamura-Nei mudelit (Tamura, Nei 1993) ning fülogeneetilise seos tuletati maksimaalse tõenäosuse meetodil (Nei, Kumar 2000).

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. PepMV määramine kiirtestiga

Testitud 25-st proovist olid kiirtesti põhjal PepMV-ga nakatunud 17 proovi ehk 68% valimikust (Tabel 5). Selle põhjal saab järeldada, et viirus on imporditud tomativiljades väga levinud, kuna üle poolte proovidest olid positiivsed. Tomatiproovid olid imporditud kaheksast riigist: Hispaania, Holland, Itaalia, Maroko, Poola, Senegal, Türgi ja Ukraina. Kiirtesti põhjal oli enim (6) positiivseid proove pärit Hispaaniast, millele järgnesid Holland (5) ja Maroko (4). Üks positiivne proov oli pärit ka nii Itaaliast kui ka Türgist. Poolast, Ukrainast ja Senegalist pärit imporditud tomatiproovidest PepMV-st käesolevas uuringus ei tuvastatud (Tabel 5).

**Tabel 5.** PepMV määramine kiirtestiga

Proovi nr.	Proovi päritolu	Kogumise kuupäev	Tulemus (+/-)
1	Holland	30.07.2018	+
2	Itaalia	22.02.2020	+
3	Hispaania	22.02.2020	-
4	Maroko	23.02.2020	+
5	Hispaania	23.02.2020	+
6	Hispaania	24.02.2020	+
7	Senegal	24.02.2020	-
8	Hispaania	25.02.2020	+
9	Hispaania	25.02.2020	+
10	Maroko	26.02.2020	-
11	Hispaania	27.02.2020	-
12	Holland	07.09.2020	+
13	Holland	14.09.2020	+
14	Holland	14.09.2020	+
15	Ukraina	29.10.2020	-
16	Türgi	31.10.2020	+
17	Ukraina	31.10.2020	-
18	Holland	02.11.2020	+
19	Poola	02.11.2020	-
20	Hispaania	02.11.2020	+
21	Maroko	02.11.2020	+
22	Hispaania	07.12.2020	+
23	Maroko	07.12.2020	-
24	Maroko	07.12.2020	-
25	Maroko	07.12.2020	+

## 3.2 PepMV molekulaarne määramine

Kuna RNA viiruste molekulaarne analüüs on väga ajamahukas ja kulukas protsess, siis tehti molekulaarne analüüs vaid neile proovidele, mis kiirtesiga positived olid. Kiirtest on positiivsete proovide selekteerimiseks kiire ja praktiline moodus, millega saab kokku hoida nii ajakulu kui ka töövahendeid.

### 3.2.1. RNA eraldamine ja kontsentratsioon

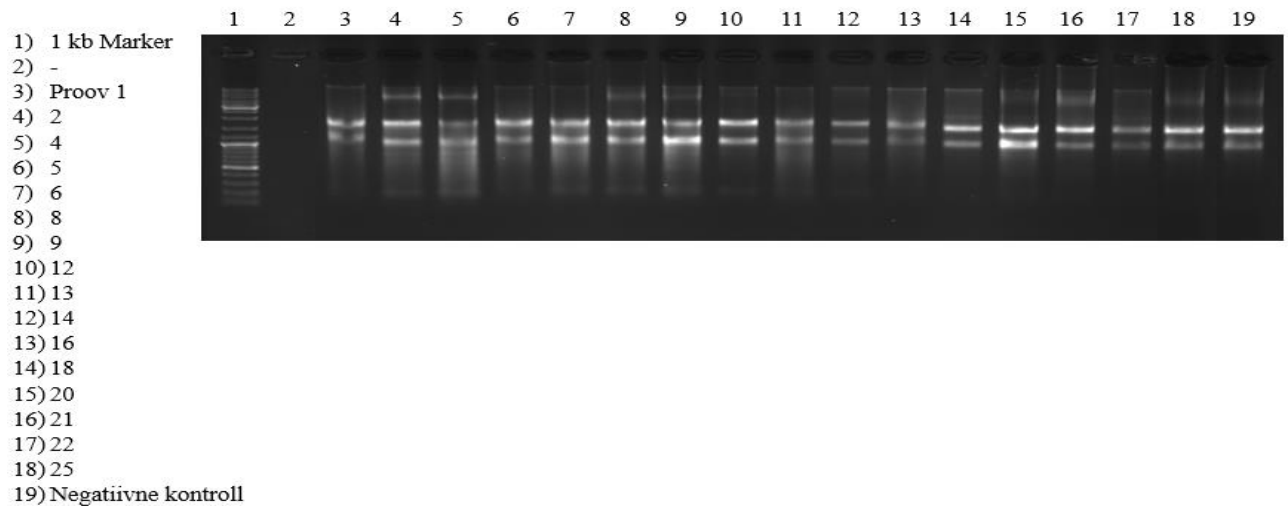
Tomati vilja proovide RNA kontsentratsioon oli vahemikus 45 – 281.5 ng/  $\mu$ l (Tabel 6). Kontsentratsioonide suur varieeruvus võis tuleneda proovide käsitlemisest RNA eraldamise käigus. RNA eraldamine tomati viljast on kompliteeritud, kuna see sisaldab arvukalt polüsahhariide (López-Casado *et al.* 2007), polüfenoole, pigmentaineid ja sekundaarseid metaboliite (Sabzevari, Hosseini 2014). Kõigi proovide RNA eraldamine läks korrektselt-RNA geelil peaks olema näha kaks fragmenti, mis on iga proovi puhul esindatud (Joonis 11).

**Tabel 6.** PepMV proovide RNA kontsentratsioonid

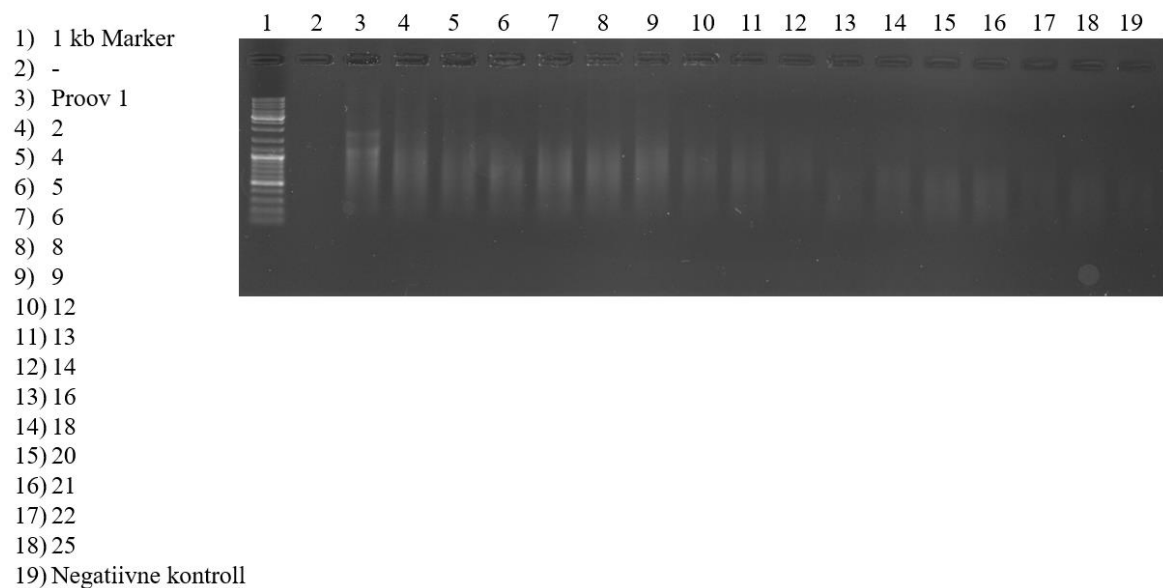
Proovi nr.	Konts. ng/ $\mu$ l
1	65
2	161.3
4	281.5
5	118.6
6	121.3
8	135.3
9	250.2
12	84
13	88
14	45
16	61.4
18	82
20	201.4
21	166.2
22	48.4
25	184.2

### 3.2.2. Pöördtranskriptsioon ehk cDNA süntees

cDNA geelil peaks olema näha ühtlane hajus pikk fragment nagu proovidel nr. 1-14. Proovidel nr. 16-25 oli cDNA pisut madalama kvaliteediga, millele viitab väiksem ja madalamal paiknev fragment agarooosi geelil (Joonis 12).



**Joonis 11.** Tomati viljadest eraldatud RNA. 1 % agaros, 135 min 35 V, 3  $\mu$ l RNA ja 1  $\mu$ l 6 x Loading Dye.

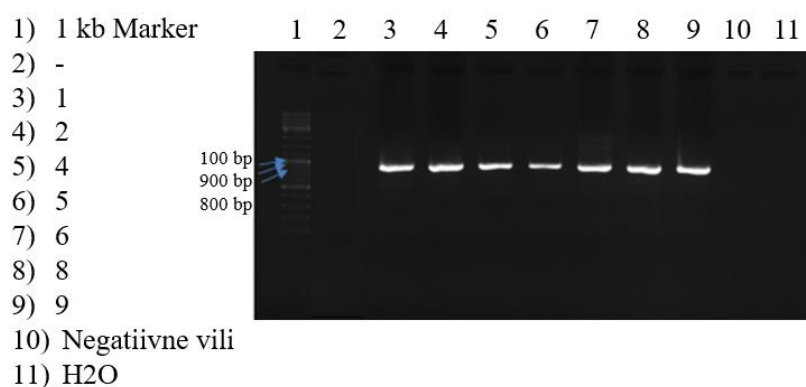


**Joonis 12.** Tomati viljadest eraldatud cDNA. 1 % agaros, 135 min 35 V, 3  $\mu$ l RNA ja 1  $\mu$ l 6 x Loading Dye.

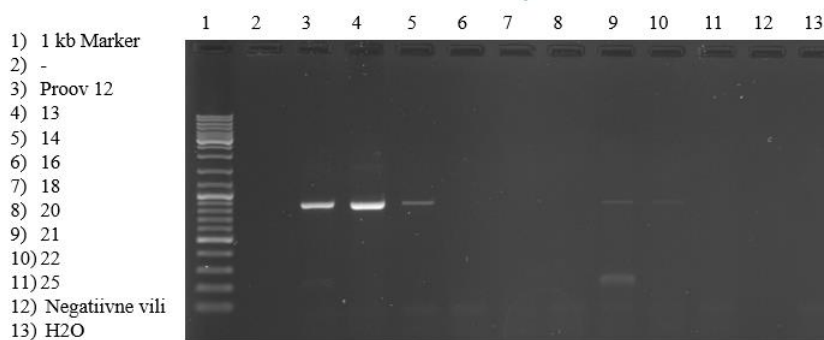


### 3.2.3. PepMV amplifikatsioon RT-PCR-ga

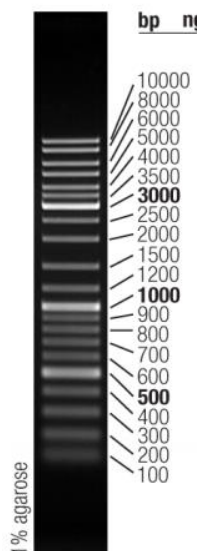
PCR põhjal osutus positiivseks 12 proovi 25-st ehk 48 % valimikust (Joonis 11-12). Kiirtesti põhjal olid aga positiivsed 5 proovi enam, st. kokku 17 proovi (68%) (Tabel 7 ja 8). See erinevus tulenes ilmselt asjaolust, et proovide nr. 16-25 cDNA oli madalama kvaliteediga ning võis sisaldada cDNA sünteesi reagentide jääke, mistõttu ilmselt ei õnnestunudki kõigist nendest proovidest viirust edukalt PCR-ga amplifitseerida. Kahest madalama cDNA kvaliteediga proovist siiski õnnestus viirust PCR-ga määrata. PCR amplifikatsiooniproduktide suurust määrati DNA markeri GeneRuler DNA Ladder Mix abil (Joonis 13).



**Joonis 11.** PCR amplifikatsiooniproduktid proovidel nr. 1-9. 1 % agaros, 135 min 35 V, 3 µl RNA ja 1 µl 6 x Loading Dye. PCR produkti suurus on 845 bp.



**Joonis 12.** PCR amplifikatsiooniproduktid proovidel nr. 12-25. 1 % agaros, 135 min 35 V, 3 µl RNA ja 1 µl 6 x Loading Dye. PCR produkti suurus on 845 bp.



**Joonis 13.** 1 kb (10 000 bp) Gene Ruler DNA Mix (Thermo Fisher Scientific).

**Tabel 7.** PepMV testide ning RNA eraldamise ja cDNA sünteesi võrdlus

Proovi nr.	Kiirtest	RNA	cDNA	PCR
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
16	+	+	MK	-
18	+	+	MK	-
20	+	+	MK	-
21	+	+	MK	+
22	+	+	MK	+
23	+	+	MK	-
25	+	+	MK	-
Negatiivne	-	+	MK	-

\*MK- madal kvaliteet, reagentide jäägid

**Tabel 8.** PepMV esinemine Eestisse imporditud tomativiljades

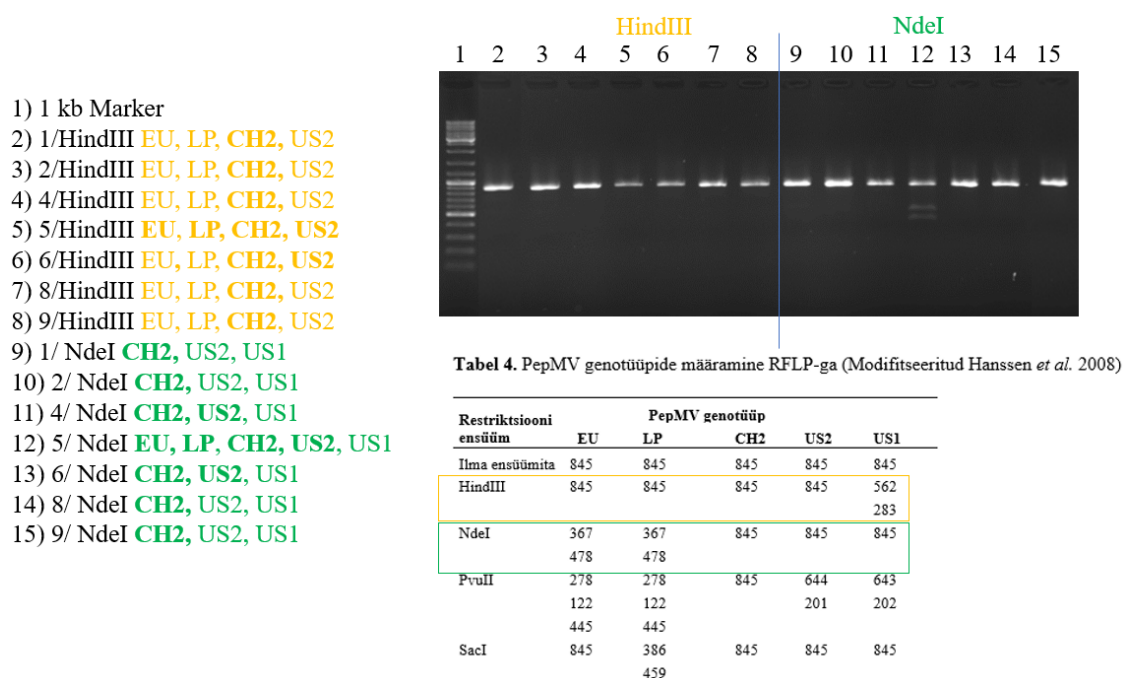
	<b>Kiirtest</b>	<b>PCR</b>
<b>Proovi päritolu</b>	<b>Nakatunud proovid/ Proovide koguarv</b>	<b>Nakatunud proovid/ Proovide koguarv</b>
Hispaania	6/8	5/8
Holland	5/5	4/5
Itaalia	1/1	1/1
Maroko	4/6	2/6
Poola	0/1	0/1
Senegal	0/1	0/1
Türgi	1/1	0/1
Ukraina	0/2	0/2
Kokku	17/25	12/25

### 3.2.4. PepMV genotüüpide määramine

Viiruse genotüübid määrati eelnevalt välja töötatud PepMV restriksioonifragmentide pikkuspolümorfismi (RFLP) meetodi abil (Hanssen jt. 2010), kasutades erinevaid restriksiooni ensüüme (*HindIII*, *NdeI*, *PvuI* ja *SacI*) (Joonis 14 - 16). Mitmeid ensüüme kasutati, kuna erinevad genotüübid avalduvad viiruse PCR amplifikatsiooni produkti erinevate ensüümidega lõigates. Proovid 20 ja 21 lõigati ainult *PvuII* ensüümiga ning genotüübilise kuuluvuse kinnitamiseks sekveneeriti DNA.

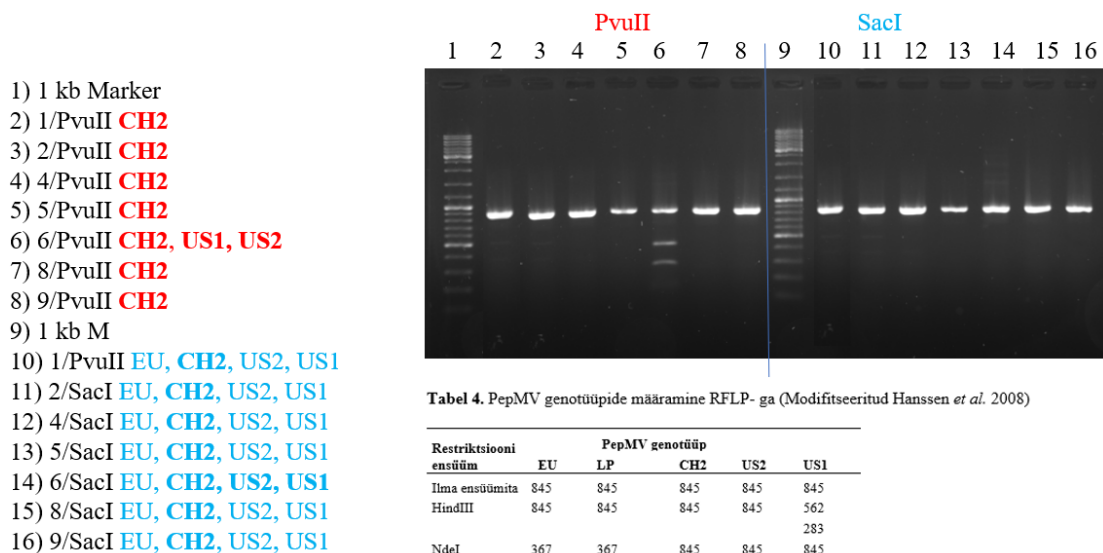
Proovid nr. 1-9 näitasid *HindIII* ensüümiga lõigates 845 bp suurust fragment (Joonis 14). See tähendab, et need proovid võisid kuuluda genotüüpidesse EU, LP, CH2 ja/ või US2 (Tabel 4). Ensüümiga *NdeI* lõigates näitasid proovid nr. 1-9 samuti 845 bp suurust fragmenti. See tähendab, et need proovid võisid kuuluda genotüüpidesse CH2, US2 ja/ või US1. Proovil

nr.5 oli aga lisaks 845 bp suurusele fragmendile ka kask lisafragmenti suurustega umbes 400 ja 300 bp. See viitab, et proov võis samaaegselt olla nakatunud lisaks CH2 ja US2 genotüübile ka EU ja/ või LP tüvedega. PvuII ensüümiga lõigates oli proovidel 1-5 ja 8-9 üks fragment suurusega 845 bp, mis kinnitas kuulumist CH2 genotüüpi. Proovil 6 olid lisaks 845 bp suurusele fragmendile nähtavad kaks umbes 200 ja 600 bp suurustega fragmenti. See viitab kuulumisele US2 ja/ või US1 genotüüpi. Ensüümiga SacI lõigates avaldus kõigil proovidel 845 bp suurune fragment, mis viitab EU, CH2, US2 ja/või US1 genotüüpi kuulumisele.



**Joonis 14.** Proovide 1-9 genotüüpide määramine HindIII ja NdeI ensüümidega.

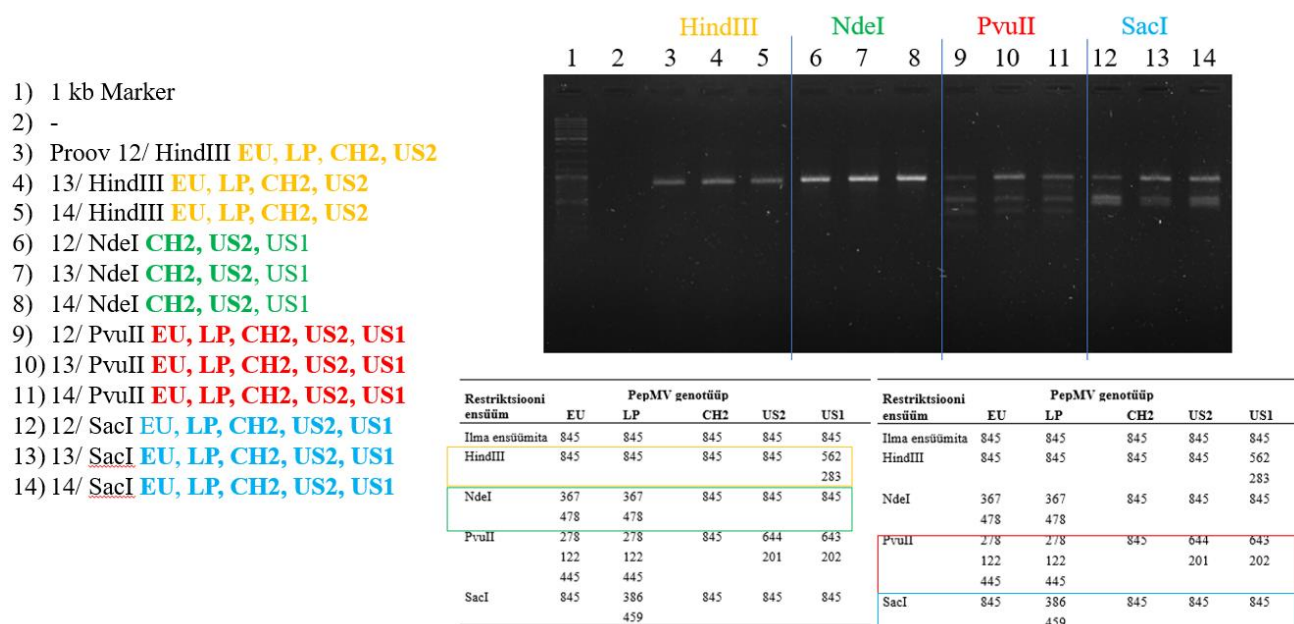
Proovidel 12-14 esines täpselt samasugune fragmentide muster (Joonis 16). HindIII ensüümiga restrikteerides oli tulemuseks 845 pikkune DNA fragment, mis viitab kuulumisse EU, LP, CH2, US1 ja/ või US2 genotüüpi. NdeI ensüümiga lõigates saadi samuti 845 bp pikkune fragment, mis viitab CH2, US2 ja/ või US1 genotüüpi kuulumisse. PvuII ensüümiga lõigates avaldus kõigil proovidel neli fragmenti pikkusega 845 ning umbes 200, 400 ja 600 fragmenti. See näitab, et proovid võisid olla nakatunud üheaegselt mitme genotüüpiga: EU, LP, CH2, US2 ja/või US1. Ka SacI ensüümiga lõikamine viitas samale tulemusele.



Tabel 4. PepMV genotüüpide määramine RFLP- ga (Modifitseeritud Hanssen *et al.* 2008)

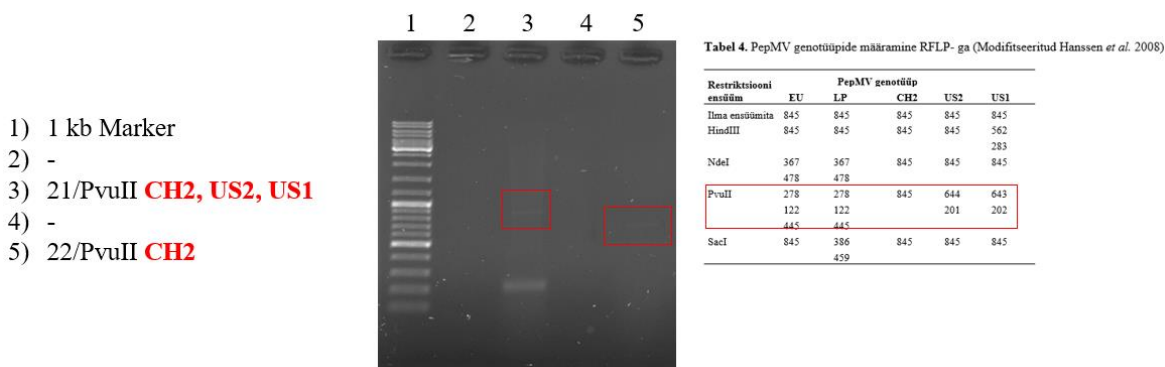
Restriktisiooni ensüüm	PepMV genotüüp				
	EU	LP	CH2	US2	US1
Ilma ensüümita	845	845	845	845	845
HindIII	845	845	845	845	562
					283
NdeI	367	367	845	845	845
	478	478			
PvuII	278	278	845	644	643
	122	122		201	202
	445	445			
SacI	845	386	845	845	845
		459			

Joonis 15. Proovide 1-9 genotüüpide määramine PvuII ja SacI ensüümidega.



Restriktisiooni ensüüm	PepMV genotüüp				
	EU	LP	CH2	US2	US1
Ilma ensüümita	845	845	845	845	845
HindIII	845	845	845	845	562
					283
NdeI	367	367	845	845	845
	478	478			
PvuII	278	278	845	644	643
	122	122		201	202
	445	445			
SacI	845	386	845	845	845
		459			

Joonis 16. Proovide 12-14 genotüüpide määramine nelja erineva ensüümiga.



**Joonis 17.** Proovide 21-22 genotüüpide määramine PvuII ensüümiga.

Proovil 21 esines PvuII ensüümiga lõigates kaks fragmenti (umbes 800 ja 200 bp), ülemine neist on näha väga õrnalt (Joonis 17). Fragmentide muster viitab, et proov võis kuuluda CH2, US1 ja /või US2 genotüüpi. Proovil nr. 22 oli väga õrnalt nähtav 845 bp suurune fragment, mis näitab, et proov kuulus CH2 genotüüpi.

Enamik proovidest (7 proovi 12-st ehk 58.3%) kuulusid RFLP põhjal genotüüpi CH2 (Tabel 9). Üks proov (nr. 6) võis olla nakatunud samaaegselt kahe genotüübiga ning neli proovi (33.33%) võisid olla nakatunud samaaegselt kolme genotüüpidega (LP, CH2 ja US2 või CH2, US2 ja US1).

**Tabel 9.** PepMV proovide genotüübiline kuuluvus

Proovi nr.	Genotüüp
1	CH2
2	CH2
4	CH2
5	CH2
6	CH2 + US2
8	CH2
9	CH2
12	LP, CH2, US2
13	LP, CH2, US2
14	LP, CH2, US2
21	CH2, US2, US1
22	CH2

### 3.2.5. PepMV proovide sekveneerimine

RFLP-st veelgi täpsema tulemuse genotüüpidesse kuulumise kohta annab aga DNA sekveneerimine ja fülogeneetiline analüüs. Proov nr. 12 DNA järjestus (Joonis 18) näitas kõrgeimat sarnasust (97.45- 99.63 %) PepMV LP genotüübile. EU genotüübile näitas proov 95.90-96.52 (Joonis 19). Proov nr. 13 oli kõige sarnasem (96.58-96.84) CH2 genotüübile (Joonis 20). Proov nr. 21 DNA järjestus näitas kõrgeimat sarnasust samuti (94.17-94.65) CH2 genotüübile (Joonis 21).

Proovide DNA nukleotiidide järjestuste joonduste (Lisa 2) ja fülogeneetiline analüüs (Joonis 23) kinnitas proovide genotüübilist kuuluvust: proov nr.12 grupeerus LP genotüübi isolaatidega ning proovid 13 ja 21 CH2 genotüübi isolaatidega.

```
GGTTTTCTCCTGCACGGGTTAGTTTTCTAAGTTTGAAATCATATTGAGTGTTT  
ACAACAATCAACTTCAACAAACAATCATGCCTGACACAACACCTGTTGCTGCC  
ACTTCAAGTGCACCACCTACAGCCAAAGATGCTGGTGCCAAAGCTCCTTCTGA  
CTTCTCAAATCCCAATACAGCTCCTAGTCTCAGTGATTTGAAGAAAGTCAAGTA  
TGTCTCCACAGTGACTTCCGTGGCCACACCAGCTGAAATTGAAGCCCTAGGCA  
AAATCTTCACCGCTATGGGCCTTGCCGCCAATGAGACTGGTCCGGCGATGTGG  
GATCTAGCTCGTGCGTATGCTGATGTGCAGAGCTCTAAATCCGCACAGCTGATT  
GGTGCTACCCCTTCCAACCCTGCATTATCACGCCGAGCCCTTGCTGCTCAGTTT  
GATCGAATCAATATAACACCCAGGCAATTTTGCATGTACTTTGCTAAAGTTGTT  
TGGAACATCCTTCTCGACAGCAATATTCCACCAGCAAATTGGGCTAAACTTGG  
TTACCAAGAAGATACAAAATTTGCTGCATTTGACTTCTTCGATGGAGTCACCAA  
CCCTGCCAGCCTGCAGCCTGCTGATGGTCTCATCAGGCAACCAAATGAGAAAG  
AACTAGCTGCTCACTCAGTAGCTAAATATGGCGCCTTGGCTAGGCAAAAGATC  
TCCACAGGTAATTATATTACCACACTTGGAGAAGTCACACGTGGACACATGGG  
TGGAGCTAACACCATGTACGCGATCGACGCACCCCCTGAACTTTAAACACTCG  
AAACTTAATCAGAGA
```

**Joonis 18.** Proovi nr. 12 sekveneeritud DNA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Pepino mosaic virus isolate LP_BPO163_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1502	1502	97%	0.0	99.75%	6408	<a href="#">gil1345606512IMF422614.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus isolate LP_BPO161_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1502	1502	97%	0.0	99.75%	6408	<a href="#">gil1345606500IMF422612.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus complete genome isolate SM.74</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1502	1502	97%	0.0	99.75%	6468	<a href="#">gil79676039IAM109896.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus complete genome isolate LP-2001</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1502	1502	97%	0.0	99.75%	6448	<a href="#">gil57282636IAJ606361.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus isolate LP_HYT25_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1485	1485	97%	0.0	99.37%	6408	<a href="#">gil1345606524IMF422616.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus coat protein gene_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1367	1367	97%	0.0	96.61%	905	<a href="#">gil1026750883IKT923154.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus strain EU-tomato_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1367	1367	97%	0.0	96.61%	6420	<a href="#">gil237861554IJ940223.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus complete genomic RNA</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1367	1367	97%	0.0	96.61%	6410	<a href="#">gil23094393IAJ438767.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus partial TGBp3 gene for triple gene block protein 3 and CP gene for coat protein ge...</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1363	1363	94%	0.0	97.55%	787	<a href="#">gil83627093IAM113849.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus isolate US3_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1361	1361	97%	0.0	96.49%	6445	<a href="#">gil1755169725IMN395046.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus complete sequence_genomic RNA isolate PepMV-H</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1361	1361	97%	0.0	96.49%	6449	<a href="#">gil125629414IAM491606.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus replicase gene_partial cds_and Orf2_Orf3_Orf4_and putative coat protein genes...</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1361	1361	97%	0.0	96.49%	3599	<a href="#">gil14388942IAF340024.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus strain US3 triple gene block protein 3 (TGB3) and coat protein (CP) genes_comple...</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1361	1361	97%	0.0	96.49%	1070	<a href="#">gil40557573IAY508411.1</a>
<a href="#">Pepino mosaic virus strain EU_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic ...</a>	1356	1356	97%	0.0	96.36%	6406	<a href="#">gil674280204IKJ018164.1</a>

**Joonis 19.** Fragment PepMV proovi nr.12 võrdlustest teiste PepvMV isolaatidega, kasutades BLAST programmi.

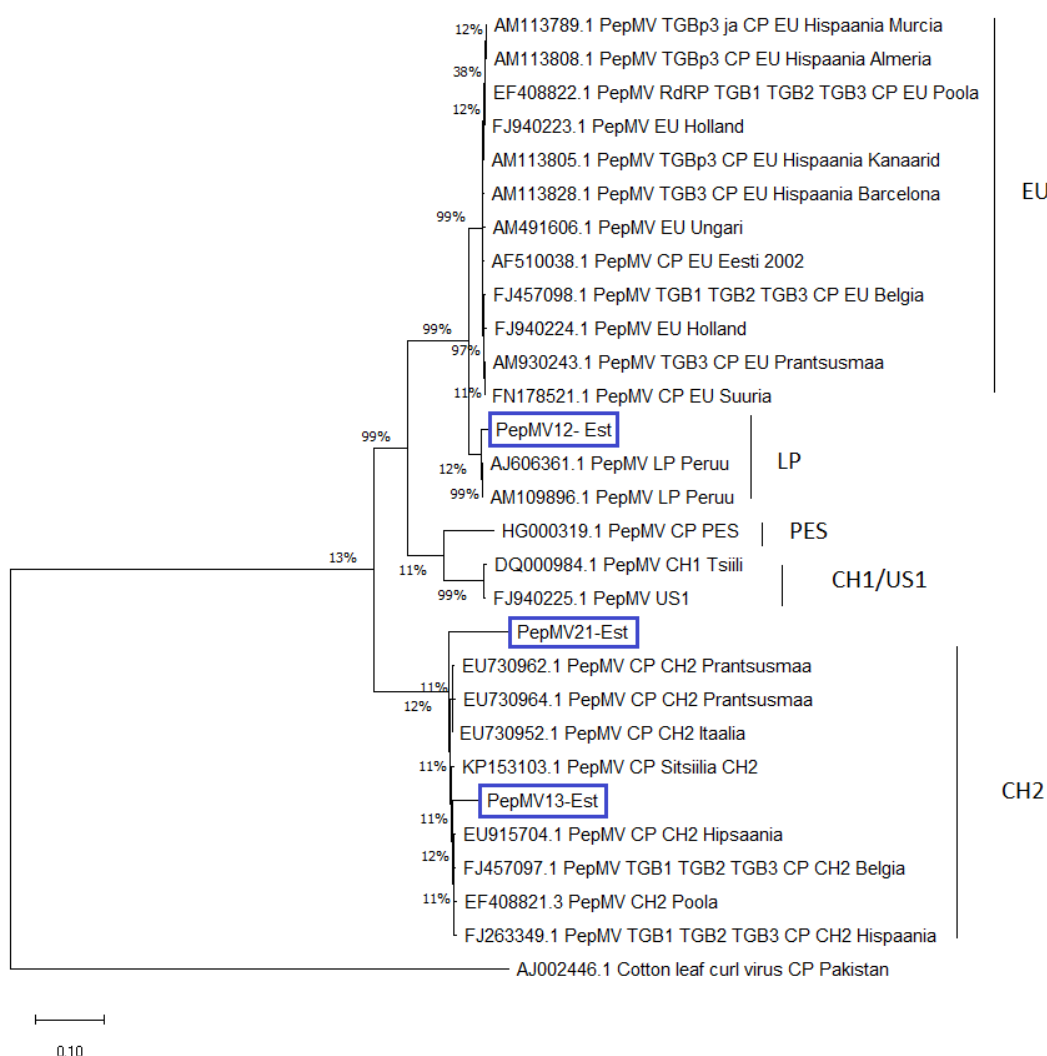
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate P19_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1317	1317	96%	0.0	96.84%	6412	<a href="#">HQ650559.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PepMV-Pa_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1317	1317	96%	0.0	96.84%	6412	<a href="#">FJ612601.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus strain PMV.21930919_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6406	<a href="#">MN182534.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PepMV-P12-3G_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6412	<a href="#">MK133092.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate CH_bpo158_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6412	<a href="#">MF422615.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate CH_bpo162_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6412	<a href="#">MF422613.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate CH_bpo160_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6412	<a href="#">MF422611.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate Mu-4-08 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)_gene_partial cds_and triple gene...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	2420	<a href="#">GU130094.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate 1906 replicase_triple gene block protein 1 (TGBp1)_triple gene block protein 2 (TGB...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6291	<a href="#">FJ457096.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus strain US2_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1312	1312	96%	0.0	96.71%	6410	<a href="#">AY509927.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate MU08_3R4D TGB1 protein_TGB2 protein_TGB3 protein_and CP protein genes_com...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MK860593.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate MZ17-7b TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550299.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate MZ17-7a TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550298.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate GR17-11b TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550239.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate GR17-11a TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550238.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate AL17-16b TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550208.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate AL17-15a TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550205.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate AL17-14b TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550204.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate AL17-13b TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550202.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate AG17-8a TGBp1_TGBp2_TGBp3_and CP genes_complete cds</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">MH550193.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate 6190 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)_gene_partial cds_and triple gene blo...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	2426	<a href="#">FJ820177.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PMU07/34 triple gene block protein 1 (TGBp1)_triple gene block protein 2 (TGBp2)_t...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1310	1310	95%	0.0	96.70%	1916	<a href="#">FJ263356.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate MU14_7_11b_Ra TGB1 protein_TGB2 protein_TGB3 protein_and CP protein genes...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1306	1306	96%	0.0	96.58%	2149	<a href="#">MK860536.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate MU14_7_11a_Ra TGB1 protein_TGB2 protein_TGB3 protein_and CP protein genes...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1306	1306	96%	0.0	96.58%	2149	<a href="#">MK860535.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate MU14_4_18b_Mo TGB1 protein_TGB2 protein_TGB3 protein_and CP protein genes...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1306	1306	96%	0.0	96.58%	2149	<a href="#">MK860512.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PepMV-P12-3H_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1306	1306	96%	0.0	96.58%	6412	<a href="#">MK133094.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus strain CH2_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1306	1306	96%	0.0	96.58%	6412	<a href="#">JN835466.1</a>

**Joonis 20.** Fragment PepMV proovi nr.13 võrdlustest teiste PepvMV isolaatidega, kasutades BLAST programmi.



	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus strain PMV.21930919_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1260	1339	97%	0.0	94.65%	6406	<a href="#">MN182534.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PepMV-P12-3G_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1260	1339	97%	0.0	94.65%	6412	<a href="#">MK133092.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate CH_bpo158_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1260	1339	97%	0.0	94.65%	6412	<a href="#">MF422615.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate CH_bpo162_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1260	1339	97%	0.0	94.65%	6412	<a href="#">MF422613.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate CH_bpo160_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1260	1339	97%	0.0	94.65%	6412	<a href="#">MF422611.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PepMV-P12-3H_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1254	1333	97%	0.0	94.53%	6412	<a href="#">MK133094.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus strain CH2_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1254	1333	97%	0.0	94.53%	6412	<a href="#">JN835466.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate P19_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1249	1322	97%	0.0	94.41%	6412	<a href="#">HQ650559.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate PepMV-Pa_complete genome</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1249	1322	97%	0.0	94.41%	6412	<a href="#">FJ612601.1</a>
✓	<a href="#">Pepino mosaic virus isolate 1906 replicase_triple gene block protein 1 (TGBp1)_triple gene block protein 2 (TGB...</a>	<a href="#">Pepino mosaic vi...</a>	1249	1328	97%	0.0	94.41%	6291	<a href="#">FJ457096.1</a>

**Joonis 21.** Fragment PepMV proovi nr.21 võrdlusest teiste PepvMV isolaatidega, kasutades BLAST programmi.



**Joonis 23.** PepMV genotüüpide fülogeneetiline analüüs. Töös sekveneeritud proovid on märgistatud sinisega.

## KOKKUVÕTE

Antud uurimustöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas Eestis müüdavad imporditud tomativiljad on nakatunud Pepiino mosaiikviirusega. Töö hüpoteesiks oli, et meie imporditud tomativiljades esineb PepMV-st. Hüpoteesi tõestamiseks viidi läbi tomati viljaproovide kogumine juhusliku valiku alusel Tallinna ja Tartu poodides. Proove analüüsiti laboris kiirtesti ning molekulaarsete meetoditega.

Töö tulemusel leiti, et kiirtesti põhjal olid PepMV-ga nakatunud 68% (17 25-st) testitud proovidest ning molekulaarse määramise põhjal oli positiivseid proove 48% valimikust (12 25-st). Põhjuseks oli asjaolu, et viiel proovil ei õnnestunud cDNA süntees. See võis tuleneda pipeteerimise tehnikast. Sekveneeritud PepMV proovidest kuulusid fülogeneetilise andmeanalüüsi põhjal Hollandist pärit positiivne proov nr. 12 LP genotüüpi ning kaks proovi kuulusid CH2 tüvesse (Hollandist ja Marokost pärit poovid nr. 13 ja 21).

PepMV genotüüpide määramine on oluline, sest see annab infot viiruse päritolu kohta ning erinevad tüved võivad põhjustada ka erinevaid sümptomeid. Kuna PepMV levib mehhaaniliselt, eksisteerib reaalne oht, et nakatunud vilja kaudu võib tomatikasvataja tahtmatult PepMV-st levitada. Imporditud tomatist pärit seemnetest tomati kasvatamine ei ole soovitatav, kuna eksisteerib risk levitada seemnetega edasikanduvaid taimeviiruseid.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aguilar, J., Hernández-Gallardo, M., Cenis, J., Lacasa, A., Aranda, M.A.** (2002). Complete sequence of the pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology*, 147, 2009-2015.
- Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, M.C., Herrera-Vásquez, J.A., Cebrián, M.C., Jordá, C.** (2010). Transmission of Pepino mosaic virus by the fungal vector *Olpidium virulentus*. *Journal of Phytopathology* 158, 217–26.
- Bibi, I., Djelouah, K., Remah A., Afechtal M.** (2017) *Pepino mosaic virus*: a serious threat to tomato crops worldwide. 5 (3): 231-237.
- Blancard D.** (2012). Tomato Diseases: Identification, Biology and Control, Second Edition. Prantsusmaa: Manson Publishing Ltd. Lk 563-564.
- BLAST, 2021. Basic Local Alignment Search Tool. [Veebileht]  
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (12.05.2021)
- Blystad D.R., Vlugt van der R., Alfaro-Fernández A., Córdoba M. del C., Bese G., Hristova D., Pospieszny H., Mehle N., Ravnikaar M., Tomassoli L., Varveri C., Nielsen S. L.** (2015) Host range and symptomatology of *Pepino mosaic virus* strains occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*.
- Britannica**, [veebileht] (2019) The Editors of Encyclopaedia. "Tomato". *Encyclopedia Britannica*,  
<https://www.britannica.com/plant/tomato> (25.04.2020)
- CABI.**                      **Invasive**                      **Species**                      **Compendium**                      [veebileht]  
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/43661#toidentity> (02.11.220)
- Córdoba-Sellés M. d. C., García-Rández A., Alfaro Fernández A., Jordá-Gutiérrez C.** (2007). Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease* 91, 1250-1254.
- Cotillon, A. C., Girard, M., & Ducouret, S.** (2002). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of Pepino mosaic virus (PepMV). *Archives of Virology* 147, 2231–2238.
- Davino, S., Accotto, G.P., Masenga, V., Torta, L., Davino, M.** (2009). Basil (*Ocimum basilicum*), a new host of Pepino mosaic virus. *Plant Pathology* 58, 407
- Davino, S., Panno, S., Iacono, G., Sabatino, L., D'Anna, F., Iapichino, G., Olmos, A., Scuderi, G., Rubio, L., Tomassoli, L., Capodici, G., Martinelli, F., Davino, M.** (2017). Genetic variation and evolutionary analysis of Pepino mosaic virus in Sicily: insights into the dispersion and epidemiology. *Plant Pathology* 66, 368–375.
- EPPO Global Database** [veebileht] <https://gd.eppo.int/reporting/article-1670> (16.04.2021)

- EPPO 2021. [veebileht] [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list) (26.05.2021)
- Ferguson G.** (2001). Management of Pepino Mosaic Virus in Greenhouse Tomatoes. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/01-017.htm#ack> (16.04.2021)
- Geneetika, 2021. Sõnastik geneetikahuvilistele. [veebileht] <http://geneetika.ee/lexicon/poordtranskriptsioon/> (03.05.2021)
- Hanssen, I.M., Paeleman, A., Wittemans, L., Goen, K., Lievens, B., Bragard, C., Vanachter, A.C.R.C., Thomma, B.P.H.J.** (2008). Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* 121, 131–146.
- Hanssen, I.M., Thomma, B.P.H.J.** (2010) *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology* 11(2), 179–189.
- Hanssen, I.M., Mumford, R., Blystad, D.R. et al.** (2010a). Seed transmission of *Pepino mosaic virus* in tomato. *European Journal of Plant Pathology* 126, 145–52.
- Harland, G., Larrinua-Craxton, S.** (2009). Tomato, A guide to the pleasures of choosing, growing and cooking. Suur Britannia: Dorling Kindersley Limited. Lk. 6-13.
- Jones, R.A.C., Koenig, R., Lesemann, D.E.** (1980). Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). - *Annals of Applied Biology*. 94(1), lk 61-68.
- Jordá, C., Lázaro Pérez, A., Martínez Culebras P.V., Lacasa, A.** (2001). First report of Pepino mosaic virus on natural hosts. *Plant Disease* 85, 1292.
- Klapwijk, J., Stijer, I.** (2000). Tomaat: overdracht pepinomozaiekvirus doorwittevlies en Macrolophus. *Vakdeel Glasgroenten* 21, 17.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P. et al.** (2007). CLUSTALW and CLUSTALX version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–8.
- López-Casado, G., Matas, A.J., Domínguez, E., Cuartero, J., Heredia, A.** (2007) Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. – *Journal of Experimental Botany* Nr. 58 (14), lk. 3875-3883.
- Mahy, B.W.J., Van Regenmortel M.H.V.** (2008). Encyclopedia of virology. Third edition.
- Mayne, S., O'Neill T., ADAS** Pepino mosaic virus of tomato – new results on strains, symptoms and persistence <https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Imported%20Publication%20Docs/Pepino%20mosaic%20virus%20PepMV%20of%20tomato.pdf> (16.04.2021)

- Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Prezelj, N., Delic, D., Vidic, U., Ravnika, M.** (2014). Survival and transmission of potato virus Y, pepino mosaic virus, and potato spindle tuber viroid in water. *Appl Environ Microbiol.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911042/> (16.04.2021)
- Moreno-Pérez, M.G., Pagán, I., Aragón-Caballero, L., Cáceres, F., Fraile, A., García-Arenal, F.** (2014). Ecological and genetic determinants of *Pepino mosaic virus* emergence. *Journal of Virology* 88, 3359–68.
- Mumford, R.A., Metcalfe, E.J.** (2001). The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* 146, 2455–60.
- Moya, A., Holmes, E. C., & Gonzalez-Candelas, F.** (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews*, 2, 279–288.
- Nei, M., Kumar, S.** (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Noël, P., Hance, T., Bragard, C.** (2014). Transmission of the *Pepino mosaic virus* by whitefly. *European Journal of Plant Pathology* 138, 23–7.
- Pikk.** Tomati integreeritud taimekaitse. [veebileht]  
[https://www.pikk.ee/upload/files/TOMAT\\_ITK\\_suunised.pdf](https://www.pikk.ee/upload/files/TOMAT_ITK_suunised.pdf) (25.04.2020).
- Roggero, P., Masenga, V., Lenzi, R., Coghe, F., Ena, S., Winter, S.** (2001). First report of Pepino mosaic virus in tomato in Italy. *Plant Pathology*, 50, 798
- Sabaratnam S.** (2021). Pepino Mosaic Virus in Greenhouses.  
[https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/plant-health/phu-pepinomosaicvirus-greenhousetomatoeess.pdf?fbclid=IwAR3OP0hLrVYM016RGPGMZ\\_V8EJJcKnGI8HBnGh\\_h2ZLnc6pX-tdEtAMlony8](https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/plant-health/phu-pepinomosaicvirus-greenhousetomatoeess.pdf?fbclid=IwAR3OP0hLrVYM016RGPGMZ_V8EJJcKnGI8HBnGh_h2ZLnc6pX-tdEtAMlony8) (16.04.2021)
- Sabzevari, A.G., Hosseini, R.** (2014) A quick, efficient, and cost-effective method for isolating high-quality total RNA from tomato fruits, suitable for molecular biology studies. – *Preparative Biochemistry & Biotechnology* Nr. 44, lk. 418-431.
- Saison, A., Gentit, P., Tassus, X. and Poliakoff, F.** (2015). Methods comparison for the detection of *pepino mosaic virus* (PepMV) on tomato seeds. - *Acta Hort.* 1069, 133-137.
- Shipp, J.L., Buitenhuis, R., Stobbs, L., Wang, K., Kim, W.S., Ferguson, G.** (2008). Vectoring of Pepino mosaic virus by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology* 153, 149– 55,
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., Prohens, J., & Nuez, F.** (2000). El Pepino mosaic virus (PepMV), una nueva amenaza para el cultivo del tomate. II. *Vida Rural*, 119, 48–52.
- Soler-Aleixandre, S., Lopez, C., Diez, M. J., Perez de Castro, A., Nuez, F.** (2005). Association of Pepino mosaic virus with tomato collapse. *Journal of Phytopathology*, 153, 464–469.

- Spence, N. J., Basham, J., Mumford, R. A., Hayman, G., Edmondson, R., Jones, D. R. (2006).** Effect of Pepino mosaic virus on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, 55, 595–606.
- Tamura, K., Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

**LISAD**

**Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Elisabeth-Lisette Kõrve,

(sünniaeg 04.07.1998)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö

Pepiino mosaiikviiruse esinemine Eestis müüdavates tomativiljades,

mille juhendajad on professor Anders Kvarnheden, *PhD*, Kadri Just, *PhD*.

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_

(allkiri)

Tartu, 3.06.2021

(kuupäev)

---

**Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Luban lõputöö kaitsmisele.

---

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)

---

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)



**Lisa 2. Fragment PepMV genotüüpide nukleotiidijärjestuste joonduste konstrueerimisest** Clustal W algoritmiga MEGA X programmis.

[illegible]